

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—110557

⑪ Int. Cl.³

A 61 L 17/00

C 09 J 3/18

識別記号

庁内整理番号

6617—4C

7016—4J

⑬ 公開 昭和55年(1980)8月26日

発明の数 3

審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 組織接着剤およびその製造方法

⑮ 特 願 昭55—13783

⑯ 出 願 昭55(1980)2月8日

優先権主張 ⑰ 1979年2月15日 ⑱ オーストリア (A T) ⑲ A1190/79

⑳ 発 明 者 オットー・シュヴァルツ
オーストリー国ウィーン・チエ
ルテスガツセ5

㉑ 発 明 者 イエンドラ・リンナウ
オーストリー国ウィーン・ラヴ
エンデルヴェーク24

㉒ 発 明 者 フランツ・レーブリツヒ

㉓ 発 明 者 トーマス・ゼーリツヒ

㉔ 出 願 人 イムノ・アクチエンゲゼルシャ
フト・フュアヒエーミツシュ・
メデイツイーニツシエ・プロド
ウクテ

オーストリー国ウィーン・イン
ドウストリーシュトラセ72

㉕ 代 理 人 弁理士 伊藤武久

オーストリー国ウィーン・ゼツ
クスシンメルガツセ5

明 細 書

1. 発明の名称 組織接着剤およびその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) フィブリノーゲンおよび第Ⅻ因子を含有する人間のまたは動物の蛋白をベースとする組織接着剤に於て、

(a) 第Ⅻ因子とフィブリノーゲンとの割合 (1gのフィブリノーゲン当りの第Ⅻ因子の単位数で表わす) が少なくとも80であること、および

(b) プラスミノゲン-活性化剤-抑制剤またはプラスミン-抑制剤、殊にアプロチニン、を1ml当り20~2000 KIE含有すること

を組合せて有することを特徴とする、上記組織接着剤。

(2) 追加的に冷間不溶性グロブリンを含有する特許請求の範囲第1項記載の組織接着剤。

(3) 追加的にアルブミンを含有する特許請求の範囲第1項または第2項記載の組織接着剤。

(4) フィブリノーゲン、冷間不溶性グロブリンおよびアルブミンを60~98:0.5~20:0~15の割合で含有しておりそして第Ⅻ因子を少なくとも7単位/mlの量で含有している特許請求の範囲第1~3項のいずれか1つに記載の組織接着剤。

(5) フィブリノーゲンを少なくとも70 mg/mlの量で含有する特許請求の範囲第1~4項のいずれか1つに記載の組織接着剤。

(6) 定置放置 (incubation) によつて3~5分後にフィブリン-γ-鎖が完全に架橋しそして2時間の定置放置によつてフィブリン-α-鎖が少なくとも35%架橋する (SDS-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動法で測定) 特許請求の範囲第1~5項のいずれか1つに記載の組織接着剤。

(7) プラズマ水点沈降物から、くえん酸ナトリウム、塩化ナトリウム、グリシン、グルコースおよびプラスミノゲン-活性化剤-抑制剤またはプラスミン-抑制剤を含有する緩衝溶液にて1回または多数回処理することによつて冷間溶解性プラズマ蛋白を除きそしてその精製された沈降

物を溶解することを特徴とする、

- (a) 第Ⅻ因子とフィブリノーゲンとの割合 (1g のフィブリノーゲン当りの第Ⅻ因子の単位数で表わす) が少なくとも80であること、および
- (b) プラスミノゲン-活性化剤-抑制剤またはプラスミン-抑制剤、殊にアプロチニン、を1ml 当り20~2000KIE含有すること
- を組合せて有し且つ、第Ⅻ因子およびフィブリノーゲンを含有する人間のまたは動物の蛋白をベースとする組織接着剤をプラスマ氷点沈降物から製造する方法。
- (8) 溶解した精製沈降物を低温氷結することによつて安定化する特許請求の範囲第7項記載の方法。
- (9) フィブリノーゲンおよび第Ⅻ因子を含有する人間のまたは動物の蛋白をベースとする組織接着剤に於て、
- (a) 第Ⅻ因子とフィブリノーゲンとの割合 (1g のフィブリノーゲン当りの第Ⅻ因子の単位数

- 3 -

た。

第二次世界大戦の間に血漿による組織接着が提案された。

最近、H. マトラス (Matras) 等によつて「ウィネル・メディツィニッシェン・グオヘンシュリスト (Wiener Medizinischen Wochenschrift)」、(1972)、第517頁に、動物実験での不適合下の維管束間神経移植の爲の、フィブリノーゲンと第Ⅻ因子とをベースとする組織接着剤が開示されている。

別のある研究はスピングラル (Spüngler) 等による「ウィネル・クリニッシェン・グオヘンシュリスト (Wiener Klinischen Wochenschrift)」、(1973)、第1~7頁]。この場合も動物実験にて、氷点沈降物およびトロンビンとしてのフィブリノーゲンによつて組織接着を行ない得ることが提示された。

これら公知の調剤は尚満足し得ないことが判つている。何故ならば、これらは組織接着剤に対して出される以下の要求をなお充分には満足していないからである：

で表わす) が少なくとも80であること、および

- (b) プラスミノゲン-活性化剤-抑制剤またはプラスミン-抑制剤、殊にアプロチニン、を1ml 当り20~2000KIE含有すること
- を組合せて有する上記組織接着剤を、人間または動物の組織または器官部分の不適合接合、創傷封じおよび止血並びに創傷治療の促進に使用する方法。
- (10) 接合すべき組織に組織接着剤を適用する以前に、トロンビンと塩化カルシウムとの混合物を該接着剤に添加するか組織上に塗布する特許請求の範囲第9項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はフィブリノーゲンおよび第Ⅻ因子を含有する人間のまたは動物の蛋白をベースとする組織接着剤に関する。

久しい以前から、出血の止血の爲あるいは創傷を封じる爲に血液凝固物質を使用することは公知である。最初のこの種の提起によつてフィブリン-タンポンあるいはフィブリン-薄板が使用され

- 4 -

- (a) 接着あるいは創傷封じの高度の自因並びに確實で且つ持続性のある止血、即ち、創傷あるいは組織界面への接着剤の良好な接着性、並びに接着剤の高い内部的強度、
- (b) 体内での接着の調節可能な持続性、
- (c) 創傷治療経過につれて接着剤を完全に吸収し得ること、
- (d) 創傷治療で要求される性質。

このことは、部分的には止血に必要とされる各凝固因子が公知の調剤に於ては互に最適な関係で存在していないことに帰因しそして接着域に於けるフィブリン溶解活性が不十分にしか抑制されていないことにも帰因している。度々、酵素的作用によつて組織接着の早期溶解が生ずる。

本発明は、これらの欠点や困難を回避することを目的としそして人間や動物の根幹の第Ⅻ因子およびフィブリノーゲンをベースとし且つ最初に述べた前提条件を満足する組織接着剤を創造することを課題としている。

本発明は、フィブリノーゲンと第Ⅻ因子とを特

- 5 -

- 5 -

定の割合で含有することが必要であるという知見および特定の量の抑制剤によつてフィブリン溶解性が抑制されるという知見に基づいている。

それによつて本発明は、以下の構成要件の組合せにある：

- (a) 第XII因子とフィブリンノーゲンとの割合 (1gのフィブリンノーゲン当りの第XII因子の単位数で表わす) が少なくとも80であること、
- (b) プラスミノゲン-活性剤-抑制剤またはプラスミン-抑制剤、殊にアプロチニン、を1ml当たり20~2000のカリクレイン-不活性剤-単位 (KIU) の量で含有すること。

有利な実施形態によれば、組織接着剤は確認できる様に効力を助成する冷間不溶解性のグロブリンを含有する。

本発明の別の特徴によれば、組織接着剤は追加的に、組織接着剤の各成分に安定化作用を施すアルブミンを含有している。

ある有利な実施形態によれば、フィブリンノーゲン、冷間不溶解性グロブリンおよびアルブミンを

60~98:0.5~20:0~15の割合で含有しておりそして第XII因子を少なくとも7単位/mlの量で含有している。

所望の効果を保証する為には、フィブリンノーゲンを少なくとも70mg/mlの量で含有するべきである。

本発明に従う組織接着剤は、ラウリル硫酸ナトリウム (SDBS)-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動法に従つて測定できる特徴ある架橋特性を有している。この試験は、組織接着剤と、1ml当たり40μmolの CaCl_2 および15NIH-単位 (米国国民衛生協会の単位 (US National Institute of the Health-Einheiten)) のトロンビンを含有する同じ容量の溶液とを混合した後、該混合物を37℃のもとで定温放置するようにして実施する。架橋度は、反応を停止し、そして蛋白中に含有される二硫化物橋の還元的開裂を尿素、ドデシル硫酸ナトリウムおよびβ-メルカプト-エタノールより成る混合物を加えることによつて行なつた後に、ゲル電気泳動によつて測定する。3~5

- 7 -

- 8 -

分後にフィブリン-γ-鎖が完全に架橋しそして2時間後にはフィブリン-β-鎖が少なくとも35%架橋することが、本発明の組織接着剤を特徴付けている。

本発明は更に、人間のあるいは動物のプラズマ氷点沈降物から出発して前述の組織接着剤を製造する方法をも包含する。この方法は、氷点沈降物から、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、グリシン、グルコースおよびプラスミノゲン-活性剤-抑制剤またはプラスミン-抑制剤を含有する緩衝溶液にて1回または多数回処理することによつて冷間溶解性プラズマ蛋白を除きそしてその精製された沈降物を溶解することを特徴とする上記組織接着剤の製法も包含している。

-20℃で氷結する人間または動物の新鮮なプラズマから氷点沈降物を製造するのが有利である。0~2℃に温度を高めた際に氷点沈降物が得られそして遠心分離によつて分離する。氷点沈降物を処理する緩衝溶液は6.0~8.0のpH-値を有するべきである。冷間溶解するプラズマ蛋白は、0~4℃

の温度に維持しながら遠心分離によつて分離除去する。精製された沈降物を次に、第XII因子とフィブリンノーゲンとの所望の割合あるいはフィブリンノーゲン、冷間不溶性グロブリンおよびアルブミンの所望の割合が達成されるまでの間、緩衝溶液にて洗浄する。

溶解した精製沈降物は低温水結することによつて安定化させてもよい。

本発明に従う組織接着剤は広汎な用途を有している。このものは、人間または動物の組織-または器官部分の不縫合接合、創傷封じおよび止血並びに創傷治療の促進に使用できる。

本発明の組織接着剤が有効に使用され得る有利な用途分野は、頭部-、鼻部-、耳部-および頸部外科、歯科、神経外科、形成外科、一般的な外科、腹部外科、胸郭-および血管外科、整形外科、傷害外科、泌尿器科、眼科および婦人科の分野に適用することである。

接合すべき組織に本発明の組織接着剤を適用する以前に、トロンビンと塩化カルシウムの混合物を該接着剤に添加するか組織上に塗布すること

- 9 -

~10~

が有利である。

本発明の方法を以下の実施例1にて更に詳細に説明する。

-20℃で低温氷結した人間の新鮮なプラズマ178.5Lを+2℃に加熱する。得られた氷点沈降物を遠心分離によつて分離しそして、1L当り6.6gの Na_2CO_3 ・くえん酸塩・ $2\text{H}_2\text{O}$ ・3.4gの NaCl ・10.0gのグリシン・13.0gのグルコース・ $1\text{H}_2\text{O}$ および50,000KIEのアプロチニンを含有するpH値6.5の8Lの緩衝溶液にて+2℃のもとで処理しそして再度+2℃のもとで遠心分離する。上記の緩衝溶液での処理および続いての遠心分離を再度繰返す。分離した沈降物を37℃に加熱することによつて液化する。

こうして得られた生成物中には、アプロチニンが1ml当り50KIEの濃度で存在している。フィブリノーゲン：冷間不溶性グロブリン：アルブミンの割合は86.2:6.7:2.2の値で測定された。この測定を、同様にSDS-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動法によつても、しかも(a)還元されていない組織緩衝剤試料および(b) β -メルカプトエタノールで

- 11 -

器に充填しそして貯蔵する為に-20℃で低温氷結する。

別の憲法に従つて、プラスミノゲン-活性剤-抑制剤あるいはプラスミン-抑制剤を、以下の実施例2によつて詳述する様に、更に後の段階で添加することも可能である：

-20℃で低温氷結した人間の新鮮なプラズマ112.5Lを+2℃に加熱する。得られた氷点沈降物を遠心分離によつてしそして、1L当り6.6gの Na_2CO_3 ・くえん酸塩・ $2\text{H}_2\text{O}$ ・3.4gの NaCl ・10.0gのグリシン・13.0gのグリコース・ $1\text{H}_2\text{O}$ を含有しpH6.5の10Lの緩衝溶液にて+2℃のもとで処理しそして再度+2℃のもとで遠心分離する。分離した沈降物を37℃に加熱することによつて液化する。こうして得られた溶液は1ml当り50KIEのアプロチニンと置換された。

こうして得られた生成物中には、フィブリノーゲン：冷間不溶性グロブリン：アルブミンの割合は91.0:53:1.1と測定された。この測定を、同様にSDS-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動法によつて、しかも(a)還元されていない組織緩衝剤試料および(b) β -メルカプトエタノールで還元された

- 13 -

特開昭55-110557(4)

還元された試料にて実施する。第XIII因子には13.8

単位/mlが認められあるいは第XIII因子とフィブリノーゲンとの割合—1gのフィブリノーゲン当りの第XIII因子の単位数で表わす—が152である。フィブリノーゲンは90.6mg/mlの量で含有されている。

この測定は以下の様に行なう：第XIII因子の単位数の測定を、第XIII因子不含のフィブリノーゲンを基材として使用しそして未知の希釈された試料を添加することによつて実現するフィブリン架橋を該試料中に含まれる第XIII因子の量の目安として使用する架橋試験によつて行なう。相応する校正曲線はブールした人間のくえん酸塩プラズマを用いて得られる。その際、測定された1mlのプラズマ当り1単位の第XIII因子を含有している。蛋白の測定はクジエルダール (Kjeldahl) による方法によつて行なう。

SDS-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動法に従う架橋試験は、5分後にフィブリン- γ の完全な架橋をそして2時間後にはフィブリン- α の68%の架橋を明らかに示した。最終生成物を最終容

- 12 -

該試料にて実施する。第XIII因子には15.7単位/mlが認められあるいは第XIII因子とフィブリノーゲンとの割合—1gのフィブリノーゲン当りの第XIII因子の単位数で表わす—は170である。フィブリノーゲンは92.1mg/mlの量で含有されている。

この測定は以下の如く行なう：第XIII因子の単位数の測定を、第XIII因子不含のフィブリノーゲンを基材として使用しそして未知の希釈された試料を添加することによつて実現するフィブリン架橋を該試料中に含まれる第XIII因子の量の目安として使用する架橋試験によつて行なう。相応する校正曲線はブールした人間のくえん酸塩プラズマにて得られる。その際、決められた1mlのプラズマ当り1単位の第XIII因子が含まれている。蛋白の測定はクジエルダールによる方法にて行なう。

SDS-ポリアクリルアミド-ゲル電気泳動法に従う架橋試験は、5分後にフィブリン- γ の完全な架橋をそして2時間後にはフィブリン- α の87%の架橋を明らかに示した。最終生成物を不返還注射器に充填しそして貯蔵する為に-20℃で低温氷結

- 14 -

する。

代理人 弁理士 伊藤 武 久



- 15 -